

①9

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 152 763**

②1 Número de solicitud: 009700443

⑤1 Int. Cl.⁷: G01N 27/327

G01N 27/414

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

②2 Fecha de presentación: **28.02.1997**④3 Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2001**Fecha de concesión: **11.07.2001**④5 Fecha de anuncio de la concesión: **16.08.2001**④5 Fecha de publicación del folleto de patente:
16.08.2001

⑦3 Titular/es:

**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
C/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Autónoma de Barcelona -
Biosensores, S.L.**⑦2 Inventor/es: **Esteve Tinto, Jaume;****Acero Leal, María Cruz;
Plaza Plaza, José Antonio;
Merlos Domingo, Ángel;
Martínez Fàbregas, Esteve;
Alegret Sanroma, Salvador;
Díez-Caballero Arnau, Teófilo;
Mendoza Plaza, Alejandro;
Rodríguez Albalat, Guillermo y
Espinosa Martí, Enrique**⑦4 Agente: **No consta**⑤4 Título: **Cubeta tubular con sensores químicos de estado integrados para aplicación a sistemas de análisis.**

⑤7 Resumen:

Cubeta tubular con sensores químicos de estado integrados para aplicación a sistemas de análisis.

Se presenta una microcubeta tubular con sensores ISFET integrados, fabricadas a partir de obleas de silicio y de obleas de vidrio. La cubeta actúa como soporte material y los ISFET como elementos sensibles de un sensor o biosensor capaz de determinar cualquier especie cuya reacción de reconocimiento conlleve la aparición en el medio de un ión, elemento, molécula o compuesto que pueda ser detectado por el sensor. La novedad que presenta esta cubeta es su tamaño, relativamente grande comparado con las obtenidas a partir de obleas de silicio, y las técnicas de fabricación, ya que además de la micromecanización del silicio y de la soldadura anódica se utiliza la mecanización del vidrio. Las cubetas se utilizan en un sistema de análisis por inyección en un flujo, FIA (Flow Injection Analysis).

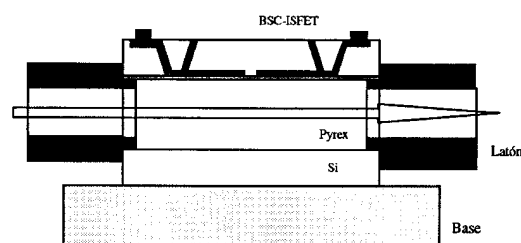


FIGURA 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

DESCRIPCION

Cubeta tubular con sensores químicos de estado sólido integrados para aplicación a sistemas de análisis.

Sector de la técnica

- Análisis químico y bioquímico
- Sistema para análisis en FIA (Flow Injection Analysis)
- Aplicación en áreas diversas: medicina, biología, veterinaria, medio ambiente, agricultura e industrias relacionadas con dichas áreas.

Estado de la Técnica

La necesidad de ampliar el campo de aplicación de los sensores químicos hacia áreas tan complejas, desde el punto de vista del análisis, como la medicina, biología, veterinaria, medio ambiente, agricultura, etc., ha llevado a desarrollar nuevos instrumentos con elementos de reconocimiento molecular cada vez más sensibles y selectivos.

Una de las técnicas de análisis más utilizadas es el análisis por inyección en un flujo, denominado FIA (Flow Injection Analysis), que consiste en inyectar la muestra que se quiere analizar en una solución portadora que circula en continuo y llevarla hasta un detector adecuado.

Como detector en un sistema FIA pueden utilizarse electrodos sensibles a iones: ISE (Ion Selective Electrode), aunque un detector muy adecuado en este caso es un ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor), debido a su pequeño tamaño, y a que da una respuesta más rápida que los ISE sin perder sensibilidad. Un sensor ISFET es un transistor MOSFET (Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor) en el que se ha substituido la puerta metálica por una solución que está en contacto directo con la membrana de puerta, que es sensible a determinados iones, moléculas o gases. La desventaja fundamental de los ISFETs es que presentan derivas con el tiempo. Utilizando un ISFET en un sistema FIA se evitan las derivas debido a que la señal se mide con relación a la línea de base característica de los sistemas FIA, y esa línea se restablece después de cada inyección de muestra. En los sistemas FIA convencionales se utilizan cubetas de metacrilato en las que se introduce el elemento sensor convenientemente encapsulado y la muestra se hace pasar por el interior de dicha cubeta (S.Alegret, J.Bartolí, C. Jiménez-Jorquera, M. del Valle, C.Domínguez, J.Esteve, J.Bausells, Flow-through pH-ISFET + reference-ISE as integrated detector in automated FIA determinations, Sensors and actuators B, 7 (1992) pp: 555-560).

En los últimos años, la aplicación de las tecnologías de micromecanización junto con la microelectrónica ha permitido el desarrollo de nuevos dispositivos sensores y actuadores. Estas tecnologías tienen también una gran potencialidad en la concepción y la fabricación de sistemas de análisis químico. En este sentido, las técnicas de micromecanización del silicio y de soldadura

anódica vidrio-silicio pueden utilizarse para obtener microceldas o microcubetas que contengan sensores y que sean utilizadas en sistemas de análisis FIA. Este tipo de microcubetas es atractivo por diversas razones: son robustas, de dimensiones reducidas, su costo de fabricación es bajo porque se fabrican en lotes, su costo de utilización es bajo puesto que se necesita una cantidad muy pequeña de muestra para obtener una respuesta y puede utilizarse en una amplia variedad de campos, para determinar diferentes elementos, moléculas o compuestos dependiendo de las características del elemento sensible del sensor utilizado.

En este sentido, y dado el gran potencial e interés de estos dispositivos, diferentes laboratorios han desarrollado prototipos de microceldas, que se describen a continuación.

H.H. van der Vlekkert y otros autores, (H.H. van der Vlekkert, N.F. de Rooij, A. Van den Berg, A. Grisel, Multi-ion sensing system based on glass-encapsulated pH-ISFETs and a pseudo-REFET, Sensors and Actuators, 131 (1990), pp. 395-400), han fabricado una cubeta con varios sensores para su utilización en análisis FIA. Los sensores se fabrican en una oblea de silicio y una vez cortados se encapsulan soldándolos anódicamente uno a uno a un vidrio que contiene unos agujeros que coinciden con el elemento sensible de los sensores. Sobre este vidrio se suelda otro en el que se ha hecho un canal utilizando la técnica de ultrasonidos. M.T. Pham y otros autores, (M.T. Pham, S. Howitz, Fluidic microcell with sensor array in Siglass Technology, Proceedings of The 7th Int. Conf. On Solid-State Sensors and Actuators Transducers 93, Yokohama, Japan (1993)), han desarrollado una microcubeta para análisis FIA que tiene dos ISFETs que operan en modo diferencial. En una oblea de silicio, con la técnica de grabado anisótropo, se hacen unos canales que tienen una sección de $200 \times 500 \mu\text{m}^2$ y una longitud de 2.4 mm. La oblea se suelda anódicamente con un vidrio que acaba de formar los canales. En la oblea de silicio se hacen unos agujeros donde se colocan las puertas de los ISFETs. En los extremos del vidrio se hacen dos agujeros que sirven para la entrada y la salida de líquidos.

M. A. Northrup y otros autores, (M. Allen Northrup, M.T. Ching, R.M. White, R.T. Watson, DNA amplification with a microfabricated reaction chamber, Proceedings of The 7th Int. Conf. On Solid-State Sensors and Actuators Transducers 93, Yokohama, Japan (1993), 924), han obtenido una microcubeta utilizada para aplicar una técnica de amplificación molecular. En una oblea de silicio han obtenido cavidades de $4 \times 6 \text{ mm}^2$ y de $5 \times 10 \text{ mm}^2$ y una profundidad determinada por el grabado anisótropo del silicio ($300 \mu\text{m}$). En el fondo de las cavidades se forma una resistencia de polisilicio. Las cavidades se sellan con un vidrio. En los extremos de la cubeta, entre el vidrio y el silicio se coloca un tubo de polietileno que se pega con silicona por ambos lados.

L.Waliman y otros autores, (L. Wallman, J. Drott, J. Nilsson, T. Laurell, A micromachined flow-Through cell for continuous pico-volume

sampling in an analytical flow, The 8th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, and Eurosensors IX. Stockholm, Sweden (1995), 303), han fabricado una microcubeta para dosificar volúmenes muy pequeños de muestra. Se ha fabricado partiendo de dos obleas de silicio, grabando en ambas una hendidura de 2 mm de ancha x 15 mm de larga x 0.35 mm de profundidad. A una de las obleas se le hace un agujero de 2 mm de diámetro, en cada uno de los extremos del canal. Estos agujeros sirven para la entrada y la salida de flujos. A la otra oblea se le hace un agujero de 60 μ m de diámetro en el centro del canal, es el dosificador. Entre la entrada y la salida se pega un disco piezo-cerámico y en los orificios de entrada y salida de flujo se pegan unos tubos de silicona.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a una microcubeta tubular con sensores ISFET integrados, que actúan respectivamente como soporte material y como elementos sensibles de un sensor (o biosensor) capaz de determinar especies cuya reacción de reconocimiento tenga como consecuencia la aparición el medio de un ión, elemento, molécula o compuesto que pueda ser detectado por dicho elemento sensible. La novedad que presenta esta cubeta es su tamaño, relativamente grande comparado con obtenidas a partir de obleas de silicio, y las técnicas de fabricación, ya que además de la micromecanización del silicio y de la soldadura anódica se utiliza la mecanización del vidrio.

Las microcubetas se fabrican soldando dos o tres obleas, silicio-vidrio o silicio-vidrio-silicio respectivamente, con la técnica de soldadura anódica. Con una sierra se mecanizan en el vidrio unos canales, que definirán las dimensiones de la cubeta. Posteriormente, mediante soldadura anódica entre el vidrio acanalado y una oblea de silicio, en la que se han fabricado previamente los ISFETs con tecnología microelectrónica, se obtiene la cubeta con los sensores integrados. El proceso de fabricación es completamente por lotes, y una vez cortadas las obleas soldadas se obtienen una serie de microcubetas cuya capacidad puede ser variable, del orden de los μ l, por lo que pueden efectuarse análisis con volúmenes muy pequeños de muestra, y con una sección que puede superar 1 mm², lo que permite el paso de partículas. La cubeta es tubular, de forma que se facilita el paso de fluidos.

Descripción detallada de la invención

La microcubeta se ha diseñado teniendo en cuenta las prestaciones que un dispositivo de estas características requiere para trabajar en un sistema de análisis FIA real: ha de ser robusto, hermético, de manejo sencillo, ha de poderse incorporar y reemplazar con facilidad en el sistema FIA y además se ha de facilitar al máximo la circulación de fluidos entre la entrada y la salida de la cubeta, minimizando las zonas en las que pueda quedar estancada parte de la muestra. Por otra parte, tanto la capacidad de la cubeta como su sección deben ser suficientemente grandes para permitir el paso de fluidos con partículas, que se son de gran interés para aplicaciones bioquímicas en las que las partículas actúan como soporte de

reactivos biológicos. Para facilitar la circulación de fluidos y de fluidos en partículas en suspensión, la microcubeta tiene forma de paralelepípedo, con la entrada y la salida situadas en los extremos del mismo (cubeta tubular). El canal por donde circula el fluido tiene una sección que puede superar 1 milímetro cuadrado, lo que impide la obturación de la cubeta durante el funcionamiento. Esto hace que las tecnologías de micromecanización convencionales no sean de utilidad para este caso debiéndose utilizar tecnologías alternativas. Por otra parte, las técnicas convencionales tampoco son aplicables para la fabricación de cubetas tubulares, que son de gran interés debido a la facilidad que representan para el flujo de las muestras, así como a la eliminación de posibles residuos.

Normalmente, la fabricación de cubetas requiere la obtención de diferentes componentes que en ser posteriormente ensamblados. El proceso de ensamblado es difícil y encarece considerablemente el proceso de fabricación, por lo que un proceso de fabricación de cubetas totalmente por lotes, y que no requiera de posteriores ensamblajes es de gran interés.

La microcubeta puede estar constituida por una estructura silicio-vidrio o silicio-vidrio-silicio, que se consigue gracias a la técnica de soldadura anódica. En cualquier caso, los sensores químicos (ISFETs), se fabrican en una oblea de silicio mediante tecnología microelectrónica. El vidrio utilizado ha de tener un coeficiente de expansión térmica cercano al del silicio y puede tener diferentes espesores. En la oblea de vidrio se han de definir los canales que constituyen el paso de fluidos por el interior de la microcubeta. Una de las novedades que se presentan es la forma de obtener dichos canales, que se efectúan mecanizando el vidrio con una sierra de un espesor apropiado, que define la sección que se quiera conseguir. La sección puede ser de más de 1 mm cuadrado, en función de la aplicación y para facilitar el tránsito de fluidos con partículas en suspensión. La mecanización del vidrio es una técnica gracias a la cual puede estructurarse el vidrio de una forma relativamente sencilla. Al poder controlar con gran precisión el movimiento y la zona de actuación de la sierra, en la oblea de vidrio se obtienen estructuras con un trazado y unas dimensiones perfectamente definidas.

Una vez que se tiene la oblea de vidrio acanalada y la oblea de silicio que contiene los ISFETs, se utiliza la técnica de soldadura anódica para unirlos. Antes de efectuar la soldadura, se ha de alinear una oblea con respecto de la otra, de manera que la zona sensible del sensor (zona de puerta), quede sobre el centro de los canales. De esta manera se consigue que la fabricación de las microcubetas sea en lotes, que es otra de las ventajas de la obtención de la microcubeta que se presenta. A continuación con una sierra se cortan las microcubetas, que en este momento adquieren sus dimensiones definitivas. Las dimensiones de la microcubeta dependen de las dimensiones del ISFET y del número de ISFETs que contengan. Por esta razón, tanto las dimensiones como la capacidad de las microcubetas pueden variar para acoplarse a las necesidades de cada sistema de

análisis concreto.

El ISFET incorporado a la microcubeta puede tener la zona de puerta en la misma cara que los contactos eléctricos (ISFETs convencionales), o en la cara opuesta (ISFETs de contactos posteriores), y se fabrica mediante tecnología microelectrónica y de micromecanización, en el caso de contactos posteriores. La soldadura anódica entre la oblea de silicio que contiene los ISFETs y la oblea de vidrio donde se han fabricado los canales se efectúa a una temperatura entre 200°C y 400°C, aplicando una tensión entre 600 y 1000 V entre los electrodos. Los canales deben alinearse con la puerta del ISFET. Por otro lado, para que la tensión umbral de los ISFETs no se vea afectada por las condiciones en las que se efectúa la soldadura anódica, se ha de apantallar la zona de puerta de los ISFETs con una capa de polisilicio, de aluminio o en general de cualquier metal, que evite que la tensión caiga directamente en la membrana. Esta capa se elimina con un grabado húmedo después de la soldadura anódica entre el vidrio y la oblea con ISFETs.

Las microcubetas tubulares con ISFETs integrados quedan definidas una vez cortadas las obleas y puede procederse a su encapsulado.

Ejemplo de realización de la invención

Siguiendo las especificaciones expuestas se han obtenido cubetas soldando tres obleas silicio-vidrio silicio. Se ha partido de una oblea de silicio de 500 micras de espesor y de una oblea de vidrio Pyrex Corning #7740 de 1 mm de espesor y se han soldado con la técnica de soldadura anódica. Una vez soldadas, con una sierra de 1 mm se hacen en el vidrio canales paralelos, sin llegar a tocar la oblea de silicio y separados 1 mm entre sí. A continuación, sobre el vidrio acanalado se suelda la oblea de silicio que contiene los ISFETs. Dicha oblea se alinea con respecto a la de vidrio de manera que la zona sensible del sensor queda sobre los canales y en el centro de lo que será la cubeta. Con una sierra se cortan las cubetas, que tienen una capacidad de 6 microlitros. Las dimensiones de la cubeta quedan determinadas en el momento de este último corte.

El ISFET incorporado a la cubeta se ha fabricado en obleas de silicio pulidas por ambas caras, que tienen un espesor de 300 m. La característica fundamental de este ISFET es que es de contactos posteriores, es decir, tiene los contactos eléctricos en la cara opuesta a la que contiene la

membrana sensible o zona de puerta del ISFET. De esta manera se facilita su encapsulado y se mejora el aislamiento entre las conexiones eléctricas y la solución, que es uno de los principales problemas que presentan los ISFETs. Para fabricar ISFETs de doble cara es necesario hacer una micromecanización en volumen del silicio a fin de obtener cavidades en las que se efectúa la metalización. Estas cavidades se consiguen mediante el grabado anisótropo del silicio en soluciones de KOH o de TMAH. Una vez fabricados los ISFETs se apantalla la membrana de puerta con una capa delgada de aluminio, para protegerla de la tensión que se aplica durante el proceso de soldadura. A continuación se efectúa la soldadura anódica de la oblea con ISFETs y el bloque silicio-vidrio acanalado. Tras la soldadura se elimina el aluminio de la zona sensible con un grabado húmedo selectivo, que no afecta al resto de componentes de la cubeta. El procesado termina con la metalización de las zonas de contacto del ISFET, que se ha realiza por deposición selectiva de níquel utilizando una técnica de deposición autocatalítica de metales (electroless plating). Este tipo de metalización tiene la ventaja de poderse efectuar una vez concluidas las microcubetas, por lo que el metal depositado no se ve afectado por el proceso de soldadura anódica. En la fotografía de la figura 1 se muestra la parte anterior y 14 posterior de una microcubeta sin el sensor. En la cara anterior puede observarse el canal mecanizado en el vidrio, con las conexiones para la entrada y la salida de fluidos. En la cara posterior se observa la oblea de silicio soldada al vidrio. En la fotografía de la figura 2 se muestra un esquema de la cubeta on un ISFET integrado. En la figura 3 se muestra una fotografía de dos cubetas obtenidas después de cortar las obleas y antes de encapsular. En una de ellas se puede apreciar la estructura silicio-vidrio-silicio y en la otra se ven las cavidades donde se hacen las conexiones del ISFET. Una vez cortadas, y ara su test se realiza un encapsulado que permita la conexión de tubos de conducción de las muestras y también las conexiones eléctricas del ISFET. En la figura 3 se muestra la fotografía de una microcubeta encapsulada de forma provisional para su test.

Descripción de las figuras

Figura 1. Esquema del corte longitudinal de una cubeta con un ISFET integrado.

REIVINDICACIONES

1. Cubeta tubular con sensores químicos de estado sólido integrados para aplicación a sistemas de análisis, **caracterizada** por su estructura tubular y tamaño, de capacidad del orden de los μl , con forma de paralelepípedo con un canal interior o canales interiores para la circulación de fluidos, de sección no mayor a 1 milímetro cuadrado, constituida por una estructura de silicio-vidrio-silicio y que lleva integrados sensores ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor), que actúan respectivamente como soporte material y como elementos sensibles de un sensor (biosensor), capaz de determinar especies cuya reacción de reconocimiento tenga como consecuencia la aparición en el

medio de un ión, elemento, molécula o compuesto, que pueda ser detectado por dicho elemento sensible.

2. Procedimiento de fabricación de cubetas según reivindicación 1, **caracterizado** porque se realiza por soldadura de dos o tres obleas, silicio-vidrio o silicio-vidrio-silicio, respectivamente con la técnica de soldadura anónica.

3. Procedimiento de fabricación de cubetas según reivindicación 1, **caracterizado** porque con una sierra se mecanizan en el vidrio unos canales interiores, que definen las dimensiones de la cubeta, por los que pasarán los fluidos, posteriormente, mediante soldadura anónica se unen el vidrio acanalado y una oblea de silicio, que contiene los sensores.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

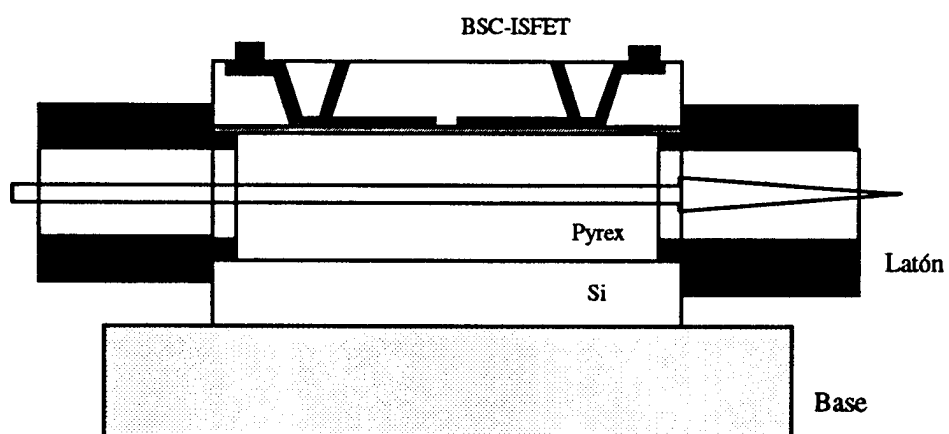


FIGURA 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 152 763
⑫ N.º solicitud: 009700443
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 28.02.1997
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.⁷: G01N 27/327, 27/414

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X Y	WO 9525275 A1 (KNOLL) 21.09.1995, todo el documento.	1 2,3
A	WO 9625619 A1 (WESTONBRIDGE INT. LTD.) 22.08.1996, todo el documento.	1-3
Y	EP 0467810 A1 (SEXTANT AVIONIQUE) 22.01.1992, todo el documento.	2,3
Y	EP 0412270 A1 (INTERNATIONAL BUSINESS MACHINES CORPORATION) 13.02.1991, todo el documento.	3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
04.12.2000

Examinador
M. Fluvà Rodríguez

Página
1/1